

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ **Offenl gungsschrift**  
⑯ **DE 197 12 195 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:  
**G 01 N 1/28**  
G 01 N 1/10  
B 01 L 3/02  
// G01N 35/00

⑯ Aktenzeichen: 197 12 195.0  
⑯ Anmeldetag: 22. 3. 97  
⑯ Offenlegungstag: 24. 9. 98

⑯ Anmelder:  
Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

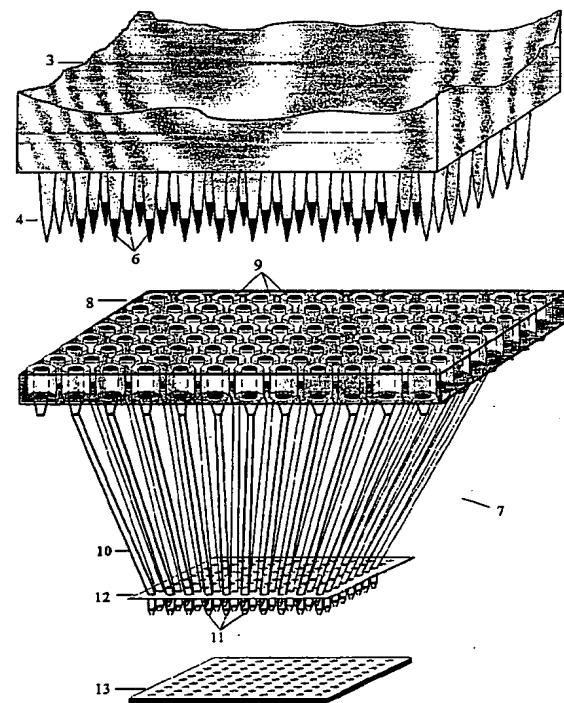
⑯ Erfinder:  
Horn, Anton, Prof. Dr., 07749 Jena, DE; Degenkolb, Ulf, 09128 Chemnitz, DE; Wölfel, Helmut, 07751 Bucha, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑯ Verfahren und Vorrichtung zum off-line Nachweis von Analyten nach MALDI-Massenspektrometrie

⑯ Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum off-line Nachweis von Analyten nach Stofftrennung mit MALDI-Massenspektrometrie. Sie findet Anwendung auf dem Gebiet der Biochemie, Molekularbiologie, in der chemischen und biotechnologischen Industrie sowie in der klinischen Chemie.

Aufgabe der Erfindung ist es, den manuellen und zeitlichen Aufwand zur Handhabung (Entnahme, Vorbehandlung und Massebestimmung), insbesondere einer Vielzahl von Proben, für massenspektrometrische Untersuchungen mit der MALDI-Technik zu verringern. Darüber hinaus sollen die Gefahr von Fehlhandhabungen im Umgang mit den Proben weitgehend ausgeschlossen und eine universelle massenspektrometrische Auswertbarkeit ermöglicht werden. Erfindungsgemäß werden die Proben des Analyten zum Zweck der Entnahme und Probenvorbereitung für die MALDI-MS durch eine an sich bekannte Multipipette gehandhabt. Von dieser werden die vorzugsweise vorbehandelten Proben (6) auch an die Probenträgerplatte (13) des MS-Spektrometers abgegeben, wobei das x-y-Rastermaß der Multipipettenspitzen (4) mittels eines Pipettenadapters (7) an das Probenaufnahmeraster der Probenträgerplatte (13) adaptiert wird.



DE 197 12 195 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum off-line Nachweis von Analyten nach MALDI-Massenpektrometrie. Sie findet Anwendung auf dem Gebiet der Biochemie, Molekularbiologie, in der chemischen und biotechnologischen Industrie sowie in der Klinischen Chemie. Hauptsächlich wird sie zur Charakterisierung von Stoffmischungen nach spezieller Behandlung, insbesondere nach chromatographischer Trennung, über das Signal "präzise Masse" verwendet.

"Matrix assisted laser desorption ion massspectrometrie" (MALDI-Spektrometrie) ist eine relativ neue Technik (Hilkenkamp et al., 1988), die aber in den vergangenen Jahren eine sehr weite Verbreitung auf vielen Gebieten der Analytik gefunden hat. Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber anderen massenspektrometrischen Techniken liegen darin, daß auch Moleküle mit großer Masse, wie Proteine, präzise bestimmbar sind und die Interpretation des Analysenergebnisses nicht oder nur minimal durch artifiziell auftretende Spaltprodukte und sekundäre Massengipfel beeinflußt wird. Außerdem ist diese robuste Technik nur wenig durch häufig in den Analyten vorkommenden Beimengungen wie Salze, Detergentien und andere Substanzen empfindlich zu stören.

Die Präzision der Massenbestimmung, die mit geeigneten Eichverfahren durchgeführt weit unter 1 Promill liegt, erlaubt die Nutzung des Signals "Präzise Masse" als spezifischen Indikator zur Charakterisierung einer Substanz und wird zur Identifizierung von Molekülen genutzt. Durch die schnelle Entwicklung von chromatographischen Techniken in den letzten Jahren ist es heute durch Wahl geeigneter Trägermaterialien und Elutionsmittel möglich, nahezu jede Substanz aus einer Mischung von sehr vielen Verunreinigungen rein darzustellen. Dazu muß die einzelne zu charakterisierende Fraktion im chromatographischen Prozeß der Stofftrennung verfolgt werden. Das geschieht on-line, wenn die zu trennende Substanz geeignete physikalische Signale liefert, die kontinuierlich verfolgt werden können. Solche häufig verfolgten Signale sind Lichtabsorption, Fluoreszenz, Leitfähigkeit, Viskosität und andere. Können solche relativ unspezifischen Signale nicht verwendet werden, muß mit spezifischen Verfahren wie immunologischen Assays (RIA, EIA) oder unter Nutzung katalytischer Eigenschaften (Enzymbestimmung) off-line in den einzelnen Fraktionen, die nach der Stofftrennung in geeigneten Gefäßen mit Fraktionssammlern aufgefangen werden, der Analyt und seine Verunreinigung untersucht werden. Naturgemäß fallen bei diesem Vorgehen eine große Zahl zu analysierender Proben an, die untersucht werden müssen. Diese Zahl ist um so größer, je dichter besetzt und damit präziser der Trenngang verfolgt werden soll. Die oben aufgeführten Vorteile der MALDI-MS machen es wünschenswert, die Bestimmung der Massenverteilung in einer Vielzahl von Proben, die während der Trennung erhalten werden, relativ spezifisch zur Bestimmung des/der Analyte(n) zu nutzen, um den gesuchten Analyten hinsichtlich seiner Verunreinigung zu charakterisieren und den Trenngang zu optimieren. Gegenwärtig müssen für ein solches Vorgehen viele einzelne Proben manuell aus den einzelnen Gefäßen der Fraktionssammlung entnommen werden, in Zwischenschriften mit geeigneten Verfahren vorbehandelt werden, um die Substanzen zu entfernen, welche die MALDI-Prozedur stören können und dann mit Matrixlösung behandelt werden. Danach muß die Analyt-Matrix-Mischung einzeln auf die Probenträgerplatte des entsprechenden MALDI-Spektrometers getropft werden und nach der Massenbestimmung eine Zuordnung der gefundenen einzelnen Massen zu den Fraktionen des Fraktionssammlers erfolgen. Infolge der Vielzahl der erforderli-

chen Proben sowie der Arbeitsschritte zu deren Vorbehandlung und massenspektrometrischer Auswertung ist der manuelle und zeitliche Arbeitsaufwand hoch und steigt mit zunehmender Probenanzahl drastisch an.

5 Hinzu kommt, daß bei Durchführung einer Pluralität prinzipiell ähnlich gelagerter monotoner Arbeitsgänge zur Probenbehandlung – psychologisch bedingt – die Gefahr von Unachtsamkeiten und Behandlungsfehlern im Umgang mit den Proben gegeben ist, wodurch das Analysenergebnis 10 schnell beeinträchtigt werden kann.

Aufgabe der Erfindung ist es deshalb, den manuellen und zeitlichen Aufwand zur Handhabung (Entnahme, Vorbehandlung, Massenanalyse, Auswertung), insbesondere einer Vielzahl von Proben, für massenspektrometrische Untersuchungen nach dem MALDI-Verfahren zu verringern. Darüber hinaus soll die Gefahr der Beeinträchtigung des Analysenergebnisses infolge von Fehlhandhabungen im Umgang mit den Proben weitgehend ausgeschlossen und eine möglichst universelle massenspektrometrische Auswertbarkeit 15 der Analyte ermöglicht werden.

Die Erfindungsgemäß werden die zu untersuchenden Proben des Analyts nicht mehr manuell zur MS-Untersuchung nach dem MALDI-Verfahren vorbereitet und gehandhabt, sondern sie werden im x-y-Raster der Pipettenspitzen einer an

25 sich bekannten Multipipette bereitgestellt. Es ist somit möglich, gleichzeitig eine Vielzahl von Proben, beispielsweise im Raster 96 (8 × 12), zu entnehmen sowie für die MS-Untersuchung (mit entsprechender Vorbehandlung) vorzubereiten. Von der Multipipette werden die Proben über einen

30 Pipettenadapter an den Probenträger des MALDI-Spektrometers abgegeben, wobei mittels geeigneter Dichtelemente und Leitungen das Probenrastermaß der Multipipette an das Probenaufnahmerraster der MS-Probenträgerplatte umgesetzt wird. Auf diese Art und Weise ermöglicht die Erfindung nicht nur eine Vorbehandlung und Vorbereitung der Proben durch die Multipipette in dem bewährten x-y-Raster der Pipettenspitzen (welches bei der Probenvorbehandlung und -Mischung eine gute Zugänglichkeit und Probenhandhabung gestattet), sondern sie gestattet auch unmittelbar die

35 Probenbeschickung des Massenspektrometers in dem spezifischen Probenaufnahmerraster des Spektrometers, ohne daß manuelle und damit verbundene zeitliche Arbeitsaufwände zur Handhabung der Proben erforderlich werden. Außerdem läuft der essentielle Prozeß der gemeinsamen Kristallisation

40 von Matrix und Probe für alle Proben eines Analyseansatzes unter standardisierten Bedingungen ab. Dadurch erhöht sich die Vergleichbarkeit der erhaltenen Signale. Außerdem wird damit auch die Grundlage dafür geschaffen, diesen Prozeß programmtechnisch ablaufen zu lassen, die Probenhandhabung automatisch steuern zu können und die Analyse und Darstellung der Ergebnisse mit geeigneten Auswerteprogrammen vorzunehmen. Mit der Automatisierung des Prozeßablaufes werden gleichzeitig subjektive Fehler, wie sie vom Grundsatz bei der Durchführung einer Pluralität ähnlich gelagerter manueller Arbeitsgänge gegeben wären, vermieden.

45 Die schnelle Handhabung sehr vieler Proben ermöglicht auch ohne großen Aufwand die Durchführung mannigfaltiger und unterschiedlicher Probenvorbereitungen oder Mehrfachanalysen, die bei manueller Probenhandhabung aus Zeit- und Aufwandsgründen praktisch nicht oder kaum realisierbar wären, jedoch zur weiteren Objektivierung des Analysenergebnisses führen.

50 Die Erfindung soll nachstehend anhand von in der Zeichnung dargestellten Ausführungsbeispielen zum MALDI-massenspektrometrischen Nachweis von Analyten näher erläutert werden.

55 Es zeigen:

**Fig. 1** Prinzipanordnung einer Mikrotiterplatte und einer Multipipette im bekannten 96-Raster zur Aufnahme (und Vorbehandlung) von Proben

**Fig. 2** Prinzipanordnung zur Pipettenadaptierung des Multipipettentasters gemäß **Fig. 1** an das  $10 \times 10$ -Raster einer Probenträgerplatte des MALDI-Spektrometers

**Fig. 3** Aufbringen der vorbereiteten Analyten aus der Multipipette über einen Pipettenadapter gemäß **Fig. 2** auf die Probenträgerplatte des MALDI-Spektrometers

**Fig. 4** Effektivität der Salzabtrennung durch Acetonfällung von BSA als Probenvorbereitung

**Fig. 5** Effektivität der Salzabtrennung durch Acetonfällung von Immunglobulinen als Probenvorbereitung

**Fig. 6** Effektivität der Tritonabtrennung durch Acetonfällung von BSA als Probenvorbereitung

**Fig. 7** Spektrenqualität als Funktion der BSA-Menge.

#### Ausführungsbeispiel 1

Anhand der **Fig. 1-3** sollen die Handhabung der Proben zur Entnahme, Vorbehandlung und Bereitstellung für die MALDI-Massenanalyse sowie die dazu verwendete Vorrichtung erläutert werden.

In einem ersten Schritt wird aus einer in **Fig. 1** gezeigten Mikrotiterplatte 1, die im  $8 \times 12$ -Raster angeordnete Probenaufnahmegeräte 2 besitzt, mit dem Kopf einer automatischen Multipipette 3, die seinerseits im gleichen  $8 \times 12$ -Raster angeordnete Pipettenspitzen 4 für die Hantierung von Volumina trägt, aus den mit Proben 5 gefüllten (dunkel dargestellten) Probenaufnahmegeräten 2 simultan eine Pluralität von mit MALDI-MS nachzuweisenden Probenvolumina 6 in die Pipettenspitzen 4 (in **Fig. 2** und **Fig. 3** ebenfalls dunkel dargestellt) aufgenommen. In einem zweiten Schritt wird zumindest ein Teil dieser Volumina in eine nicht in der Zeichnung dargestellte Misch- und Probenvorbehandlungskammer, die eine wie in **Fig. 1** gezeigte herkömmliche Mikrotiterplatte 1 sein kann und die im gleichen Rastermaß angeordnete Einzelgefäß (Probenaufnahmegeräte 2) trägt, abgegeben. In dieser Misch- und Probenvorbehandlungskammer erfolgt im einfachsten Fall die Zugabe von geeigneter Matrixlösung und die Mischung von Probe und Matrix mit an sich bekannten Multipipetten 3 und (aus Übersichtsgründen nicht in der Zeichnung dargestellten) Mikrotiterplatten-Schüttlern.

Müssen störende Salze oder andere Begleitstoffe, wie Detergentien, entfernt werden, kann in dieser Misch- und Probenvorbehandlungskammer eine Probenvorbehandlung (siehe Ausführungsbeispiele 2-4) durchgeführt werden.

In einem dritten Schritt wird in Analogie zum ersten Schritt in die (auch als Igelspitzen bezeichneten) Pipettenspitzen 4 die in **Fig. 2** und **Fig. 3** dunkel dargestellten Probenvolumina 6 der so vorbehandelten Proben 5 aufgenommen.

Danach wird in einem vierten Schritt ein Pipettenadapter 7 an die Pipettenspitzen 4 der Multipipette 3 form- bzw. kraftschlüssig angedockt (**Fig. 3**). Der Pipettenadapter 7 besteht aus einer Halteplatte 8 für schwimmend gelagerte Dichtelemente 9, sowie aus Leitungen 10, die jeweils mit ihrem oberen Ende mit dem korrespondierenden Dichtelement 9 verbunden sind und mit ihren anderen Enden 11 durch eine Fixierplatte 12 so aufgenommen werden, daß die Enden 11 in einem neuen zu einer Probenträgerplatte 13 eines MALDI-Massenspektrometers paßfähigen Rastermaß angeordnet sind. Die Dichtelemente 9 sind "schwimmend" gelagert, d. h. sowohl horizontal als auch vertikal in gewissen Grenzen beweglich angeordnet, so daß sie sich bei der Aufnahme der Pipettenspitzen 4 selbst für den Formschlußzentrieren.

In einem fünften Schritt werden zumindest Teile der in den Pipettenspitzen 4 befindlichen Probenvolumina 6 der Probe-Matrix-Mischung über die angedockten Dichtelemente 9 und die Leitungen 10 des Pipettenadapters 7 auf die Proben tragende Bereiche der Probenträgerplatte 13 abgegeben und nach an sich bekannter Kristallisation der MALDI-Massenspektrometrie zugeführt.

#### Ausführungsbeispiel 2

Zur Vorbereitung der Proben für die MALDI-Massenpektrometrie wird eine Salzabtrennung durch Acetonfällung von BSA durchgeführt.

In die Mikrotiterplatte 1 im  $8 \times 12$  Raster (vgl. **Fig. 1**) wird eine BSA-Lösung so pipettiert, daß durch Mischung mit verschiedenen konzentrierten NaCl-Lösungen jeweils  $200 \mu\text{l}$  Lösung mit  $c_{\text{BSA}} = 2 \text{ g/l}$  ( $m_{\text{BSA}} = 400 \mu\text{g}$ ) und  $c_{\text{NaCl}} = 0; 0,005; 0,1; 0,5; 1, 1,5; 2 \text{ M}$  entstehen. Mit der Multipipette 3 im  $8 \times 12$  Raster ihrer Pipettenspitzen 4 werden zu den Proben jeweils  $200 \mu\text{l}$  Aceton oder  $400 \mu\text{l}$  Aceton gegeben. Daraus ergeben sich Acetonendkonzentrationen von 50 bzw. 66%. Die Mikrotiterplatte 1 wird auf Grund der hohen Flüchtigkeit von Aceton mit einer Folie abgeklebt und 10 min. bei  $4000 \text{ g}$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Es werden nun der Überstand mit der Multipipette 3 abgenommen, zum Niederschlag jeweils  $400 \mu\text{l}$  96%iges Aceton pipettiert und nochmals 10 min. bei  $4000 \text{ g}$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes mit der Multipipette, wird die verbleibende Flüssigkeit abgedampft. Das Albumin wird nun in  $330 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O}$  zu einer Konzentration von  $20 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  gelöst. Hierzu werden  $200 \mu\text{l}$  zur Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen. Die acetonhaltigen Überstände werden zur NaCl-Konzentrationsbestimmung gesammelt.

Mit der Multipipette 3 werden  $50 \mu\text{l}$  in eine Mikrotiterplatte 1 pipettiert, in dessen Mischgefäß sich bereits  $50 \mu\text{l}$  der Matrixlösung (20 g/l Sinapinsäure in 66% Acetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$ ) für das MALDI-MS befanden. Nach 5minütiger Mischung werden hierzu jeweils  $50 \mu\text{l}$  von der Multipipette 3 angesaugt. Nun wird der Pipettenadapter 7 so am Pipettenstiel (Pipettenspitzen 4) befestigt, daß die Dichtelemente 9 dicht mit den Pipettenspitzen 4 abschließen. Unter dem Pipettenadapter 7 ist die Probenträgerplatte 13 positioniert, so daß das Raster der Enden 11 von den Leitungen 10 mit dem Probenaufnahmegeraster ( $10 \times 10$ ) der Probenträgerplatte 13 korrespondiert.

Zunächst wird der Pipettenadapter 7 als in sich dichtes System durch Ausstoß von  $30 \mu\text{l}$  der Probenvolumina 6 aus den Pipettenspitzen 4 gefüllt. Dann werden die Probenträgerplatte 13 des MALDI-MS unter dem Pipettenadapter 7 positioniert sowie ein Probenvolumen 6 von  $2 \mu\text{l}$  im Probenaufnahmegeraster von  $10 \times 10$  an die Probenträgerplatte 13 abgegeben.

Nach einer Trocknungszeit von 10 min werden die Proben mittels MALDI-MS analysiert.

Die Analyse im Massenspektrometer ergab Massenspektren in der selben Qualität, wie sie vom BSA aus salzfreier Lösung ohne vorherige Fällungsprozedur gewonnen werden.

Die Proteinausbeute wird durch die Extinktionmessung bei  $280 \text{ nm}$  bestimmt und mittels Messung der elektrischen Leitfähigkeit ist es möglich, die Salzkonzentration im Überstand zu ermitteln.

Die Effektivität der Salzabtrennung durch Acetonfällung von BSA als Probenvorbereitung ist in **Fig. 4** dargestellt. Die Kürzel WF und Ac stehen dabei für die Begriffe Wiederfindung bzw. Aceton. Es wird deutlich, daß eine 50% Acetonlösung nur ausreichend ist, wenn die NaCl-Konzen-

tration im Bereich von 0,1 bis 0,5 M liegt. Dagegen kann man BSA durch 66% Acetonlösung bis zu einer 1,5 M Salzlösung quantitativ ausfällen. In diesen Konzentrationsbereichen bleibt das gesamte Salz in Lösung. Erst bei einer 2 molaren NaCl-Lösung wurde das Löslichkeitsprodukt durch 50% (ca. 10% des NaCl fiel aus) bzw. 66% Aceton (ca. 15% fiel aus) überschritten. Albumin schlägt in salzfreier Lösung nicht durch Aceton nieder.

#### Ausführungsbeispiel 3

In gleicher Weise, wie im Ausführungsbeispiel 2 anhand der Salzabtrennung durch Acetonfällung von BSA beschrieben, wird zur Vorbereitung der Proben für die MALDI-Massenspektrometrie eine Salzabtrennung durch Acetonfällung von Gamma-Globulinlösung durchgeführt.

Fig. 5 zeigt die Ergebnisse dieser Acetonfällung.

Das Immunglobulin zeigte bereits bei nur 50% Aceton auch noch bis 2 M NaCl-Lösung einen Niederschlag von ca. 80%. Bei 66% Aceton fällt aber deutlich mehr Protein in den Niederschlag (zwischen  $c_{\text{NaCl}} = 0,005$  bis 2 M ca. 85–100%).

Auch hier bleibt im ganzen untersuchten Konzentrationsbereich das gesamte Salz im Überstand; und auch die Analyse im Massenspektrometer ergab Massenspektren in der selben Qualität, wie sie vom Immunglobulin aus salzfreier Lösung ohne vorherige Fällungsprozedur gewonnen werden.

#### Ausführungsbeispiel 4

50 M NaCl so auf Blottfoliestücke ( $a = 20 \text{ mm}^2$ ) pipettiert, daß auf einem Foliestück jeweils 0,5; 1; 3; 6; 10; oder 15 µg BSA aufgetropft werden. Als Blottfolie kommen Nitrocellulose und PVDF zur Anwendung. Die Folien mit dem eingetrockneten Albumin werden in einem verschließbaren Glas-

gefäß (in der Zeichnung nicht dargestellt) durch 400 µl 85%iges Aceton aufgelöst und dabei das Protein ausgefällt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation mit 5800 g bei 4°C wurde der Überstand mittels Pipette dekandierte. Danach werden der Niederschlag nochmals mit 200 µl 96%igem Aceton versetzt, erneut zentrifugiert und der Überstand wieder dekandierte. Der Niederschlag wird zur Trockne gebracht.

Mittels einer Matrixlösung aus 10 g/l Sinapinsäure in 55 66% Acetonitril/H<sub>2</sub>O wird der Niederschlag auf 5 pmol/µl (0,3 µg/µl) aufgelöst. Jeweils 2 µl (beim Einsatz von lediglich 0,5 µg wird alles pipettiert) dieser Gemisches werden auf die Probenpositionen der MALDI-MS-Probenträgerplatte 13 aufgebracht. Nach einer Trocknungszeit von 10 min. 60 werden die Proben im MS analysiert. Ein Wert für die Qualität des erhaltenen Spektrums wurde durch das Verhältnis aus der Peakhöhe zur Amplitude des Grundrauschens ermittelt.

Wie Fig. 7 zeigt, ist die relative Peakhöhe im untersuchten Intervall eindeutig von der einsetzten Proteinmenge abhängig. Dabei wurde ein auswertbares Proteinsignal schon bei nur 1 µg (16 pmol) Einsatz erzielt. Allerdings kann man von guten Signalen erst bei einem Einsatz von 3 µg bei Nitrocellulosefolie und 6 µg bei PVDF-Folie sprechen.

30

#### Bezugszeichenliste

- 1 Mikrotiterplatte
- 2 Probenaufnahmefäß
- 3 Multipipette
- 4 Pipettenspitze
- 5 Probe
- 6 Probevolumen
- 7 Pipettadapter
- 8 Halteplatte
- 9 Dichtelement
- 10 Leitung
- 11 Endc
- 12 Fixierplatte
- 13 Probenträgerplatte

45

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum off-line Nachweis von Analyten nach der MALDI-Massenspektrometrie, bei der die nachzuweisenden Proben entnommen sowie zur massenspektrometrischen Untersuchung vorbehandelt und auf einer Probenträgerplatte eines MALDI-Spektrometers bereitgestellt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben in einer Vielzahl von Probengefäßen im definierten x-y-Raster einer an sich bekannten Multipipette angeordnet werden, aus denen sie mit den Pipettenspitzen der Multipipette entnommen werden, daß zumindest ein Teil dieser entnommenen Probenvolumina aus der Multipipette in eine Vielzahl von im gleichen x-y-Raster angeordneten Mischgefäßen zum Zweck der Probenvorbehandlung abgegeben werden, daß mit derselben oder einer anderen Multipipette gleichen x-y-Rasters der Pipettenspitzen aus den Mischgefäßen mit den vorbehandelten Proben zumindest ein Teil der Mischungen aufgenommen wird, der über einen Pipettenadapter zur Anpassung an das Probenaufnahmeraster der Probenträgerplatte des MALDI-Spek-

#### Ausführungsbeispiel 5

65

Zur Ermittlung des kleinsten hantierbaren Einsatzes für die Acetonfällung wird eine BSA-Lösung (2 g/l BSA, 0,15

trometers auf diese für die massenspektrometrische Untersuchung und Auswertung dosiert abgegeben wird.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenvorbehandlung eine Mischung der Proben mit geeigneten Matrixlösungen durchgeführt wird. 5

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenvorbehandlung eine Fällung mit organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Aceton, darstellt. 10

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Probenvorbehandlung eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt wird. 15

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Handhabung der Proben (Entnahme, Vorbehandlung Massenanalyse) und die Auswertung der Analysenergebnisse programmtechnisch gesteuert werden. 20

6. Vorrichtung zum off-line Nachweis von Analyten nach der MALDI-Massenspektrometrie, bei der die nachzuweisenden Proben in Probengefäßen mit Pipetten entnommen und in Mischgefäße zur Probenvorbehandlung abgegeben werden und bei welcher die vorbehandelten Proben auf eine Probenträgerplatte eines 25 MALDI-Spektrometers zur MS-Analyse abgegeben werden, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufnahme und Abgabe der nachzuweisenden und der vorbehandelten Proben (5, 6) eine an sich bekannte Multipipette (3) vorgesehen ist, deren Pipettenspitzen (4) in einem 30 definierten x-y-Raster angeordnet sind, daß die Probengefäße (2) und die Mischgefäße das gleiche x-y-Raster zur Probenaufnahme bzw. -abgabe aufweisen, und daß ein Pipettenadapter (7) vorgesehen ist, welcher an seiner der Multipipette (3) zugewandten Seite mit den Pipettenspitzen (4) der Multipipette (3) in Anzahl sowie x-y-Raster korrespondierende Dichtelemente (9) zur kraft- bzw. formschlüssigen Aufnahme der Pipettenspitzen (4) besitzt, daß die Dichtelemente (9) des Pipettenadapters (7) mit Leitungen (10) in Verbindung stehen, die zur Abgabe der vorzugsweise vorbehandelten Proben (5, 6) an die Probenträgerplatte (13) des MS-Spektrometers dienen und in deren Probenaufnahmcraster angeordnet enden. 35

7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das x-y-Raster der Pipettenspitzen (4) dem 96 (8 x 12) bzw. n x 96 Raster an sich bekannter Mikrotiterplatten (1) entspricht. 45

8. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtelemente (9) in einer Halteplatte (8) schwimmend zueinander angeordnet sind. 50

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

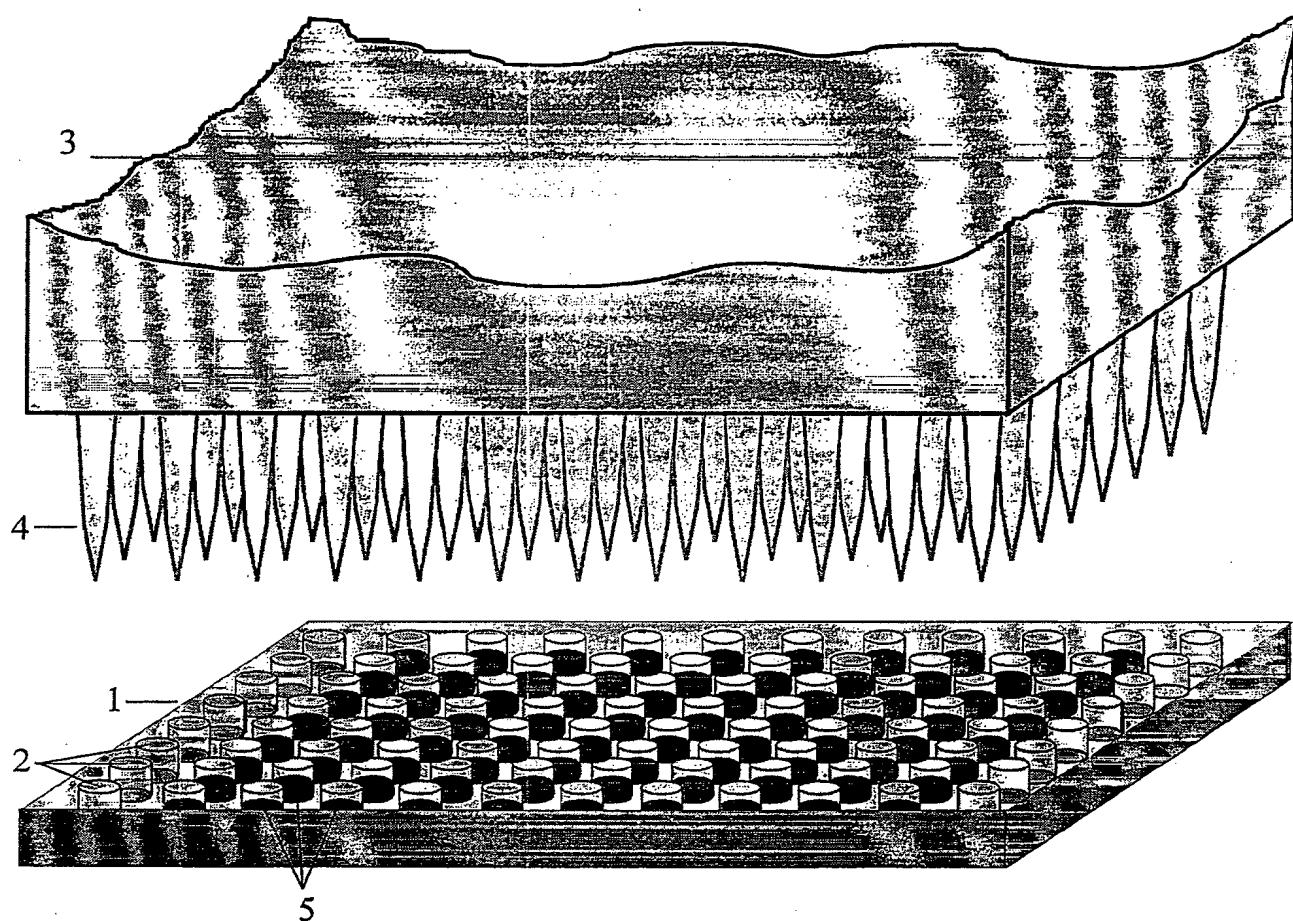


Fig. 2:

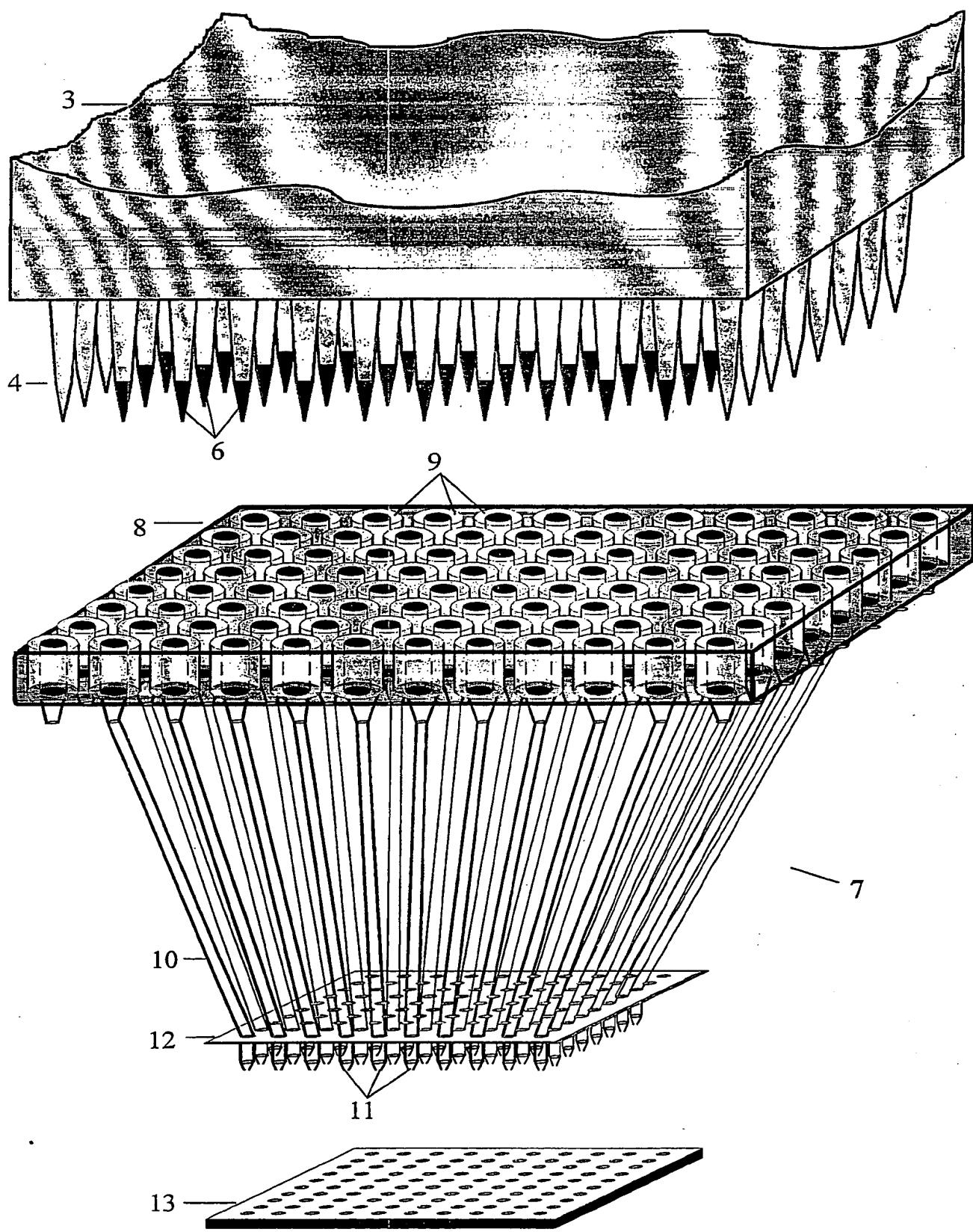


Fig. 3:

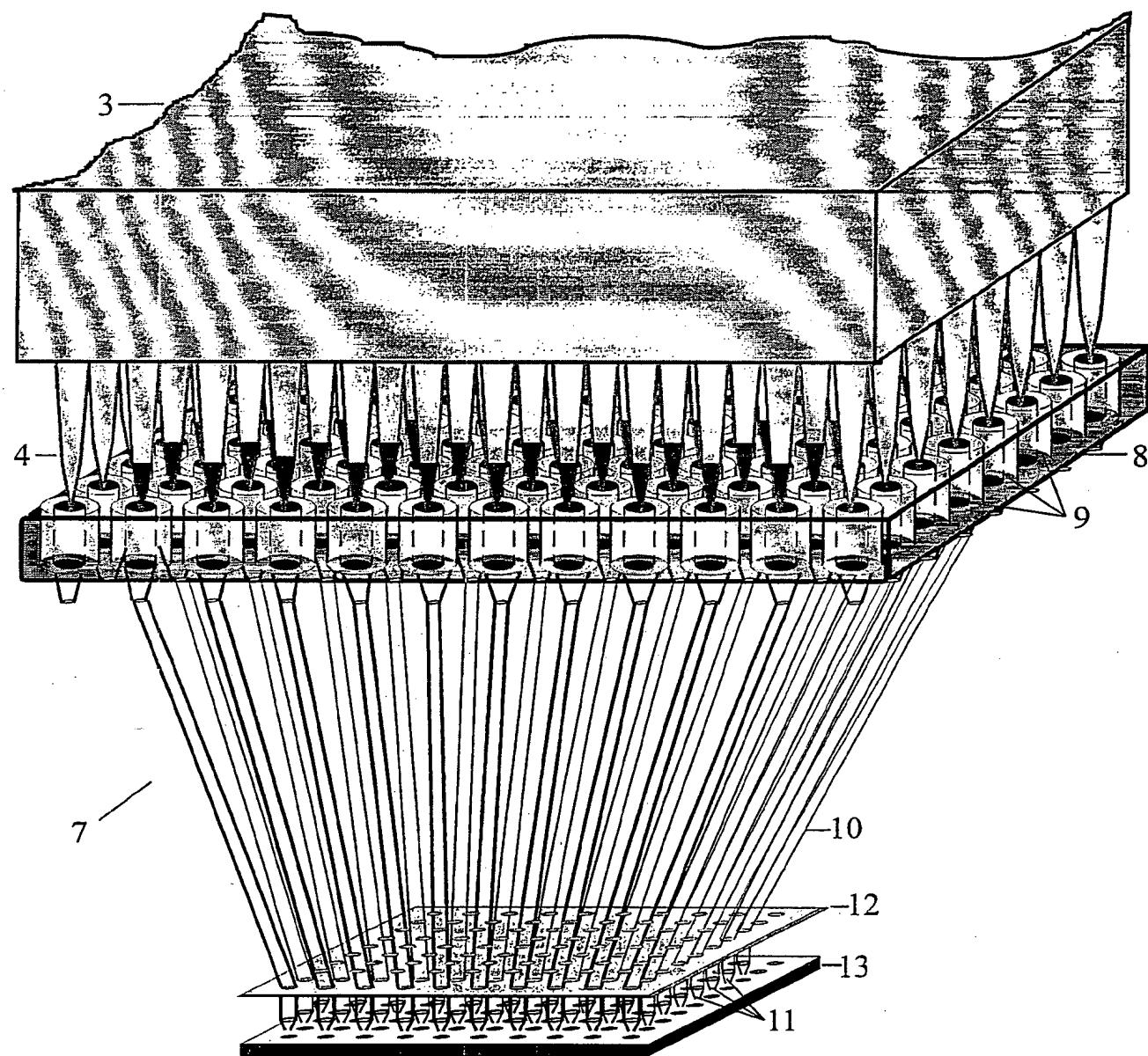


Fig.4

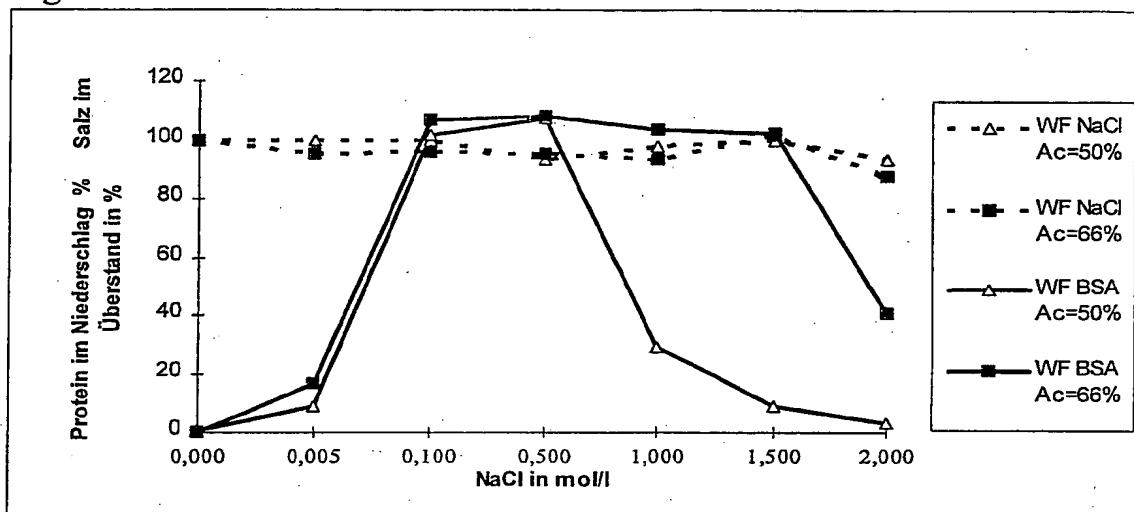


Fig.5

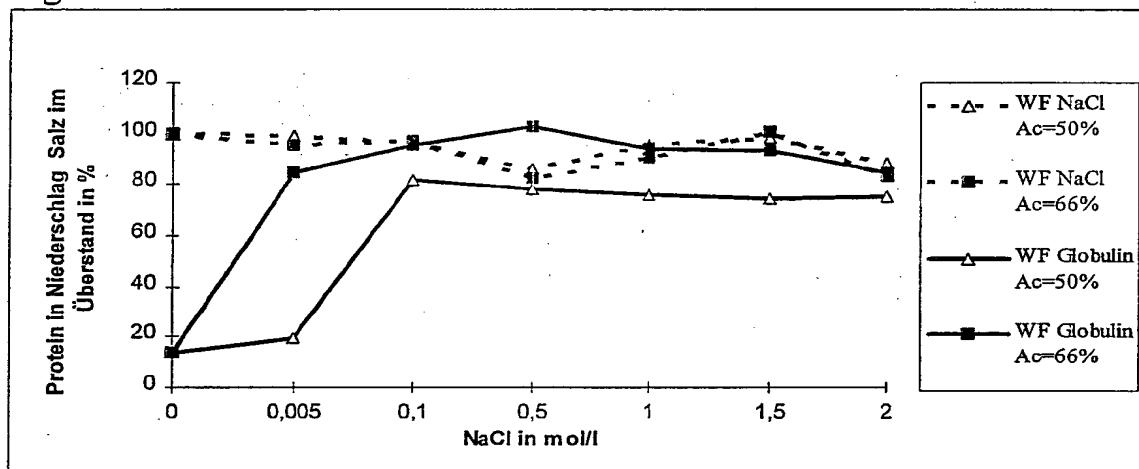


Fig.6

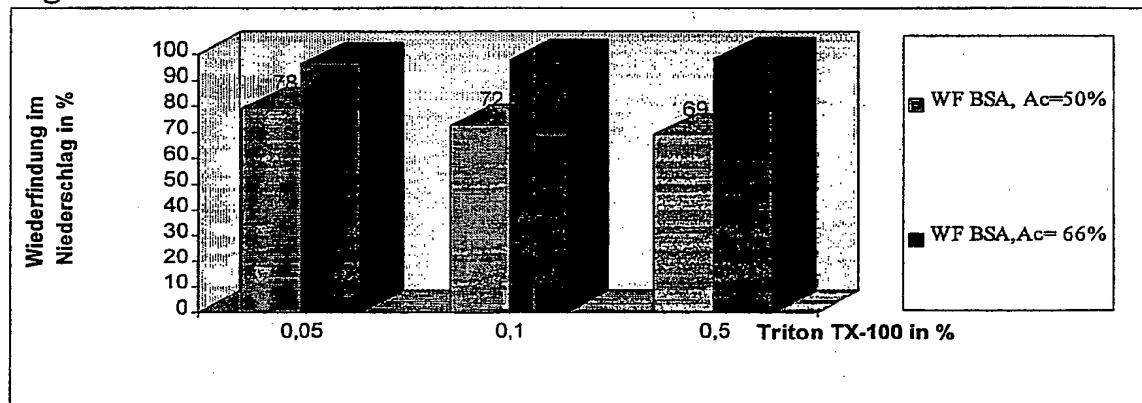


Fig. 7

